

Scientific Bulletin of Namangan State University

Volume 1 | Issue 5

Article 12

5-10-2019

MICROBIAL PROCESSING OF CELLULOSE CONTAINING RAW MATERIALS

Sokhibjon Abdusamatovich Abdusamatov
National University of Uzbekistan

Dilfuza Fazlitdin kizi Djamalova
Skolkovo Institute of Science and Technology

Alimardon Akmal ugli Umruzakov
National University of Uzbekistan

Shurigin Vladimirovich Vyacheslav
National University of Uzbekistan

Follow this and additional works at: <https://uzjournals.edu.uz/namdu>

 Part of the [Education Commons](#)

Recommended Citation

Abdusamatov, Sokhibjon Abdusamatovich; Djamalova, Dilfuza Fazlitdin kizi; Umruzakov, Alimardon Akmal ugli; and Vyacheslav, Shurigin Vladimirovich (2019) "MICROBIAL PROCESSING OF CELLULOSE CONTAINING RAW MATERIALS," *Scientific Bulletin of Namangan State University*: Vol. 1 : Iss. 5 , Article 12.

Available at: <https://uzjournals.edu.uz/namdu/vol1/iss5/12>

This Article is brought to you for free and open access by 2030 Uzbekistan Research Online. It has been accepted for inclusion in Scientific Bulletin of Namangan State University by an authorized editor of 2030 Uzbekistan Research Online. For more information, please contact brownman91@mail.ru.

MICROBIAL PROCESSING OF CELLULOSE CONTAINING RAW MATERIALS

Cover Page Footnote

???????

Erratum

???????

МИКРОБНАЯ ПЕРЕРАБОТКА ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

Абдусаматов Сохибжон Абдусаматович¹, Джамалова Дилфуза Фазлитдин кизи²,
Умрузаков Алимардон Акмал угли¹, Шурыгин Вячеслав Владимирович¹, Давранов
Кахрамон¹

1 - Национальный университет Узбекистана

2 – Сколковский институт науки и технологии

Аннотация: Целью настоящих исследований явилась оценка возможности использования *Trichoderma harzianum* 857, выделенного нами из почвы Узбекистана, в качестве источника целлюлолитических ферментов для переработки целлюлозосодержащих субстратов. Установлено, что гриб *Trichoderma harzianum* 857, благодаря синтезу внеклеточных целлюлолитических ферментов, может быть использован для гидролиза целлюлозосодержащих субстратов (пшеничной соломы). Подобраны условия предварительной обработки целлюлозосодержащего субстрата (100°C, при 1 атм. в течение 1,5 часа) для повышения эффективности их ферментативного расщепления. Показано, что внесение в состав целлюлозосодержащих субстратов соломы амаранта, способствует обогащению готового продукта белком, витаминами и микроэлементами, что даёт возможность использовать его в качестве высокобелкового продукта.

Ключевые слова: Целлюлоза, фермент, солома, пшеница, амарант, *Trichoderma harzianum*

ЦЕЛЛЮЛОЗАТУТУВЧИ ХОМ-АШЁЛАРНИ МИКРОБЛАР ЁРДАМИДА ҚАЙТА ИШЛАШ

Абдусаматов Сохибжон Абдусаматович¹, Джамалова Дилфуза Фазлитдин кизи²,
Умрузаков Алимардон Акмал ўгли¹, Шурыгин Вячеслав Владимирович¹, Давранов
Кахрамон¹

1- Ўзбекистон Миллий университети

2- Илм ва технология Сколково институти

Аннотация: Ушбу тадқиқотнинг мақсади. Ўзбекистон тупрогидан ажратиб олинган ва *Trichoderma harzianum* 857, деб аталган замбуругдан целлюлоза сақловчи субстратларни қайта ишлаш хусусиятига эга бўлган целлюлолитик ферментлар манбаи сифатида фойдаланиш имкониятини баҳолашдан иборат. *Trichoderma harzianum* 857 хужайра ташқарисида тўпланадиган целлюлолитик ферментлар синтез қилганликлари сабабли, целлюлоза сақловчи субстратларни (буғдой сомони) гидролиз қилаолиши аниқланган. Целлюлоза сақловчи субстратларни ферментатив гидролизга тайёрлаш ва жараённинг самарадорлигини ошириш шароитлари (100°C, 1 атм босим, 1,5 соат) ишлаб чиқилган. Целлюлоза сақловчи субстратлар таркибига амарант ўсимлиги сомони а라штириш, тайёр махсулотни оқсил моддалари, витаминлар ва микроэлементлар

билан бойишига олиб келиши кўрсатилган, бу эса тайёрланган махсулотдан юқори миқдорда оқсил сақловчи препарат сифатида фойдаланиш мумкин эканлигини кўрсатади.

Калит сўзлар: Целлюлоза, фермент, сомон, буғдой, амарант, *Trichoderma harzianum*

MICROBIAL PROCESSING OF CELLULOSE CONTAINING RAW MATERIALS

Abdusamatov Sokhibjon Abdusamatovich¹, Djamalova Dilfuza Fazlitdin kizi², Umruzakov Alimardon Akmal ugli¹, Shurigin Vyacheslav Vladimirovich¹, Davranov Kakhramon¹

1.National University of Uzbekistan

2.Skolkovo Institute of Science and Technology

Abstract: The purpose of these studies was to assess the possibility of using *Trichoderma harzianum* 857, isolated from the soil of Uzbekistan, as a source of cellulolytic enzymes for processing of cellulose-containing substrates. It was established that the fungus *Trichoderma harzianum* 857, due to synthesis of extracellular cellulolytic enzymes, can be used for hydrolysis of cellulose-containing substrates (wheat straw). The conditions for pretreatment of cellulose-containing substrate (100°C, at 1 atm., for 1.5 hours) were selected to increase the efficiency of their enzymatic cleavage. It was shown that adding amaranth straw to a composition of cellulose-containing substrates contributes to the enrichment of the final product with protein, vitamins and trace elements, which makes it possible to use it as a high-protein product.

Keywords: cellulose, enzyme, straw, wheat, amaranth, *Trichoderma harzianum*

Благодаря способности синтезировать и секретировать комплекс целлюлолитических ферментов: эндо-1,4-β-глюканазы (К.Ф. 3.2.1.4.); экзо-1,4-β-глюканазы (целлобиогидролаза или 1,4-β-D-гликозидглюкогидролаза К.Ф. 3.2.1.91) и целлобиаза β-глюкозидазы (К.Ф. 3.2.1.21), грибы рода *Trichoderma* широко используются во многих биотехнологических процессах, связанных с переработкой целлюлозосодержащих материалов [1-4]. Эти грибы очень технологичны, нетребовательны к субстрату и устойчивы к экологическим воздействиям.

Характерной особенностью грибов рода *Trichoderma* является синтез внеклеточных целлюлаз. Эти грибы в процессе своего развития накапливают большое количество белковых веществ в питательной среде. Благодаря этим свойствам некоторые штаммы играют ведущую роль среди промышленных продуцентов целлюлолитических ферментов, что объясняется, по крайней мере, двумя причинами: во-первых, их высокой секреторной способностью, а во-вторых, разнообразием состава синтезируемого ферментного комплекса. В состав целлюлазных комплексов различных микроорганизмов входят в различном соотношении 4 типа ферментов: эндоглюканазы, экзоглюканазы, целлобиогидролазы и целлобиазы. Каждый из перечисленных типов ферментов в зависимости от источника (продуцента) целлюлазного комплекса может содержать множественные молекулярные формы фермента, различающиеся по удельной активности, стабильности,

прочности адсорбции на поверхности нерастворимого субстрата, субстратной специфичности, степени ингибирования продуктами гидролиза и т.д. [1].

Экзоглюканазы или целлобиогидролазы (1,4- β -глюкан целлобиогидролазы К.Ф. 3.2.1-91), отщепляющие целлобиозу с конца полисахаридной цепи, обычно имеют высокую активность к кристаллической целлюлозе. Гриб *Trichoderma reesei* синтезирует две молекулярные формы целлобиогидролазы: 1 - форма (CBHI), атакует целлюлозную цепь с её нередуцирующего конца, тогда как эндоглюканазы (К.Ф. 3.2.1.4) катализируют реакцию расщепления целлюлозы посередине, производя при этом новые концы цепей для воздействия целлобиогидролаз [5].

Благодаря исследованиям, проведённым в последние годы, достигнуто детальное понимание основных закономерностей ферментативного гидролиза целлюлозы, в то время как практическая реализация процесса ферментативного получения глюкозы из целлюлозосодержащих материалов всё ещё остаётся недостаточно изученным.

Целью настоящих исследований явилась оценка возможности использования *Trichoderma harzianum* 857, выделенного нами из почвы Узбекистана, в качестве источника целлюлолитических ферментов для переработки целлюлозосодержащих субстратов. Штамм депонирован в Коллекцию промышленно-важных микроорганизмов Института микробиологии АН РУз под номером 857.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм *Trichoderma harzianum* 857 на средах Чапека-Докса и сусло агаре образует быстрорастущие колонии. Мицелий гриба бесцветный, септированный, распростёртый. На 4-5 сутки роста появляются дерновинки с конидиеносцами, подушковидные сначала белые, со временем жёлтого или тёмно-зелёного цвета. Фиалиды бутыльчатые (9-12 μ) расположены мутовками по 3 и более. На каждой фиалиде образуются конидии, склеенные в головку. Конидии гриба округлые, гладкие, мелкие (3-5 μ), в проходящем свете бледно-зелёные, а в массе – тёмные.

В качестве источника целлюлолитических ферментов использовали культуральную жидкость 4-5 суточного гриба или водную вытяжку из поверхностно выращенного гриба *Trichoderma harzianum* 857, а в качестве субстрата солому амаранта и пшеницы.

Для ферментативной обработки целлюлозосодержащих субстратов, культуральную жидкость или водную вытяжку из поверхностно выращенного гриба *Trichoderma harzianum* 857 стандартизовали так, чтобы на 1 грамма перерабатываемого субстрата приходилось 10 единиц целлюлолитической активности. Для глубинного культивирования была использована модифицированная среда, описанная Mandels [6], в состав которой были включены целлюлозосодержащий субстрат (измельчённая солома амаранта) в качестве источника углерода, вместо 2% сахарозы и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в качестве источника азота, вместо $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. При этом способе культивирования, мицелий гриба отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин, а в случае поверхностного

культивирования, по окончании времени ферментации, либо использовали всю смесь питательной среды с выросшим грибом, либо использовали водную вытяжку этой смеси, полученную путём прессования, соблюдая при этом правило: на 1 г перерабатываемого субстрата – 10 ед целлюлолитической активности.

При разработке режимов твердофазной ферментации целлюлозосодержащих субстратов, в качестве сырья использовались предварительно подготовленная надземная часть амаранта и солома озимой пшеницы.

Посевным материалом служил мицелий 5-суточной культуры гриба *Trichoderma harzianum* 857, выращенный на агаризованной среде Чапека -Докса при температуре 28-32°C, а также минеральной среде, описанной Mandels [6], с диском фильтровальной бумаги в качестве единственного источника углерода и целлюлозный агар.

В качестве инокулята была использована суспензия культуральной среды *Trichoderma harzianum* 857, полученная при его культивировании на питательной среде, основная часть которой состояла из соломы амаранта и пшеничных отрубей. Целлюлолитическая активность посевного материала составляла 25-27 ед/мл. Культивирование проводили в конических колбах объёмом 1 л (лабораторные эксперименты) и на специальных ячейках размером 30х40 см в стерильном субстрате при влажности субстрата 10%, высота слоя субстрата не превышала 50-55 мм, на среде, состоящей из пшеничных отрубей (50%) и измельчённой надземной части амаранта или соломы (50%) увлажнённой минеральной средой, описанной Mandels [6] (полупромышленные эксперименты). Исходное значение pH - 4,7-4,9.

Материалами ферментативной переработки служили вторичные отходы растениеводства - биомасса надземной части растения амарант и солома озимой пшеницы, высушенные до остаточной влажности 6-7% и измельченные до размера частиц - 1,5-2,0 мм.

Выделение и исследование свойств культуры проводили с использованием стандартных методик [7].

Ферментативный гидролиз целлюлозосодержащих субстратов осуществляли в следующем режиме: к 1 г субстрата (надземная часть амаранта или солома озимой пшеницы) добавляли 10 мл водопроводной воды и нагревали до 100°C, кипятили в течение 5 мин. После охлаждения до комнатной температуры, к смеси добавляли культуральную жидкость гриба *Trichoderma harzianum* 857 из расчета 10 ед фермента на 1 г субстрата. Перемешивали с помощью мешалки со скоростью 150 об/мин при температуре 32-35°C. Исходное значение pH-4,7-4,9. Эффективность деструкции оценивали по накоплению редуцирующих веществ.

Метод основан на восстановлении ионов меди (Cu^{+2}) из щелочного раствора Мюллера до гемииоксида меди (Cu_2O) редуцирующими веществами при добавлении избыточного количества раствора йода и титровании избытка его раствором тиосульфата натрия [8].

Определение ферментативной активности целлюлазы с использованием в качестве субстрата хроматографической бумаги.

Метод основан на количественном определении восстанавливающих сахаров, образующихся в результате гидролиза целлюлозы под действием ферментов целлюлолитического комплекса [9].

За единицу целлюлолитической активности (1 ед ЦлА) принято количество фермента, которое катализирует гидролиз целлюлозы с образованием 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (в пересчете на глюкозу) за 1 час при температуре 32°C и pH 4,7.

Содержание восстанавливающих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяли колориметрическим методом с использованием калия железосинеродистого (красной кровяной соли, калия гексацианоферрата) и рассчитывали по градуировочному графику, построенному для глюкозы. Диапазон измерений контролируемого показателя 0,5-25,0 ед ЦлА.

Для приготовления стандартных растворов глюкозы, первоначально готовили основной стандартный раствор с концентрацией глюкозы 1 мкмоль/см³ (180 мкг/см³). Для этого навеску безводной глюкозы массой 90 мг, взятую с точностью до 0,2 мг, вносили в мерную колбу вместимостью 500 см³, растворяли (от 30 до 50 см³), доводили объем до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали.

Из основного стандартного раствора глюкозы готовили серию разведений в соответствии с таблицей 1.

Для построения градуировочного графика, в серию пробирок вносили по 2 см³ стандартного раствора глюкозы и добавляли 6 см³ раствора гексацианоферрата калия. Пробирки помещали в кипящую водяную баню на 10 мин, затем вынимали и охлаждали до комнатной температуры. Измеряли оптическую плотность окрашенных растворов при длине волны 400-440 нм и толщине поглощающего слоя 10 мм против дистиллированной воды.

На основании полученных результатов строили градуировочный график зависимости значений оптической плотности от концентрации глюкозы (мкмоль/см³). По оси абсцисс откладывали молярные концентрации глюкозы мкмоль/см³, по оси ординат - оптические плотности в единицах ОП. График имеет обратную линейную зависимость. Рабочая зона градуировочного графика лежит в пределах от 0,3 до 0,6 мкмоль/см³ глюкозы, что соответствует поглощению в единицах оптической плотности от 0,50 до 0,65 ед ОП.

Таблица 1

Стандартные разведения глюкозы

Объем стандартного * раствора с молярной (массовой) концентрацией глюкозы, мкмоль/см ³	Объем буферного раствора, см ³	Концентрация глюкозы в разведении	
		Массовая мкг/см ³	Молярная мкмоль/см ³
2	8	36	0,20

3	7	54	0,30
4	6	72	0,40
5	5	90	0,50
6	4	108	0,60
7	3	126	0,70
8	2	144	0,80

*стандартные растворы глюкозы готовят в день построения градуировочного графика из трех параллельных навесок.

Для построения каждой точки градуировочного графика, вычисляли среднее арифметическое значение оптической плотности трех параллельных измерений.

Рабочий раствор фермента готовили путём разведения в дистиллированной воде, таким образом, чтобы при определении активности, оптические плотности опытного и контрольного растворов находились в пределах рабочей зоны градуировочного графика.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Надземная часть как амаранта так и зерновых культур является целлюлозосодержащим материалом, обладающим невысокой питательной ценностью и состоящим, в основном, из полисахаридов (табл. 2). Характерной особенностью химического состава и ограниченной питательности этих материалов является высокое содержание целлюлозы и клетчатки, и очень небольшое количество протеина и жира, бедность минеральными веществами и отсутствие витаминов, кроме того, солома зерновых культур в чистом виде плохо поедается животными, и её компоненты плохо перевариваются.

Питательные компоненты соломы заключены в прочный лигнин - целлюлозный комплекс, плохо разрушаемый в желудочно - кишечном тракте животных. Клетчатка соломы пшеницы состоит на 35-45% из целлюлозы, на 14-20% из лигнина, на 20-30% из пентозанов и на 3-5% из кремниевых солей. Чем выше содержание в соломе клетчатки, тем ниже её кормовая ценность [10].

Таблица 2

Химический состав соломы пшеницы и надземной части амаранта

Ингредиенты	Содержание, % а.с.в.	
	Солома пшеницы	Фитомасса амаранта
Целлюлоза	41,52±0,40	29,2±0,07
Гемицеллюлоза	23,23±0,13	18,2±0,12
Лигнин	21,37±0,81	21,4±0,62
Сырая клетчатка	34,02±0,84	24,0±0,05

Сырой протеин	4,52±0,09	28,0±0,3
Жир	1,46±0,17	3,5±0,004
Зола	4,14±0,04	10,01±0,04

Тем не менее, солома пшеницы является перспективным целлюлозосодержащим сырьём, потенциальным пищевым продуктом. Разработка оптимальных условий биоконверсии этого вида сырья может способствовать получению ряда ценных продуктов (см. табл. 2).

В отличие от пшеницы, зеленая масса и зерно амаранта без предварительной обработки могут широко использоваться на кормовые, пищевые и технические цели, поскольку по содержанию белка, витаминов, биологические активных веществ и жиров, они превосходят многие традиционные сельскохозяйственные культуры (табл. 3).

Таблица 3

Сравнительная характеристика важнейших сельскохозяйственных растений

Растения	Урожайность, т/га	Содержание белка		Содержание лизина, кг/га
		%	кг/га	
Пшеница озимая	5,0	11,0	500	18,0
Ячмень яровой	2,0	11,5	510	18,0
Рапс	2,2	20,0	440	26,0
Горох	2,0	24,0	440	29,0
Подсолнечник	2,3	18,0	414	15,0
Соя	1,5	40,0	650	33,0
Люцерна (сухой вес фитомассы)	10,0	20,0	2000	82,0
Амарант (сухой вес фитомассы)	15,0	20,0	3000	180,0

Как видно из таблицы 3, урожайность, выход белка и содержание лизина в пересчете на гектар, значительно выше чем у многих традиционных культур. В полевых условиях урожай зелёной массы амаранта достигает 80 т/га, а в среднем для Узбекистана может быть оценен в 40-45 т/га. Биологический урожай семян достигает 5 т/га, но из-за растянутого периода созревания и отсутствия специальной уборочной техники, хозяйственный урожай составляет 1,5-2,0 т/га. Из 50 т урожая амаранта можно получить до 2,0 т высоколизинового белка, тогда как у пшеницы и ячменя этот показатель равен 0,05 т (см. табл. 3).

Говоря о химическом составе амаранта, необходимо сразу отметить высокую пластичность растения, которая обуславливает большие расхождения в зависимости от агротехнологических условий культивирования, сорта, климата, возраста растений в момент сбора урожая. Необходимо также отметить, что химический состав амаранта изучается, прежде всего, с точки зрения питательной и пищевой

ценности, поэтому детально изучены содержание белка, его аминокислотный состав, содержание некоторых витаминов и минеральных веществ. Другие классы растительных веществ у амаранта, такие как, целлюлоза, гемицеллюлоза, и лигнин, изучены очень слабо, либо совсем не изучались. Имеющиеся литературные данные убедительно свидетельствуют о том, что фитомасса амаранта может быть использована в кормопроизводстве и без дополнительных переработок.

Белок амаранта характеризуется высоким содержанием незаменимых аминокислот. В 1 кг сухого вещества вегетативной массы содержится 7,1-7,15 г лизина, а у кукурузы – 2,8 г, т.е. в 2,4 раза меньше. В зелёной массе амаранта в пересчёте на а.с.в.: сырого протеина - 15,6-16,75% (в листьях до 30%), жира – 2,4-2,8%; клетчатки – 16-21,7%; кальция – 2,1-2,6%; фосфора – 0,2-0,21%; каротина – 160-200 мг. Для сравнения, зелёная масса кукурузы в фазу молочно-восковой спелости зерна, содержит 7,5-8,0% протеина, что в 2 раза меньше, чем в амаранте. В зерне амаранта содержится 15-17,8% протеина, 5-7% жира, 3,2-6,4% клетчатки, 3,0-4,1% золы.

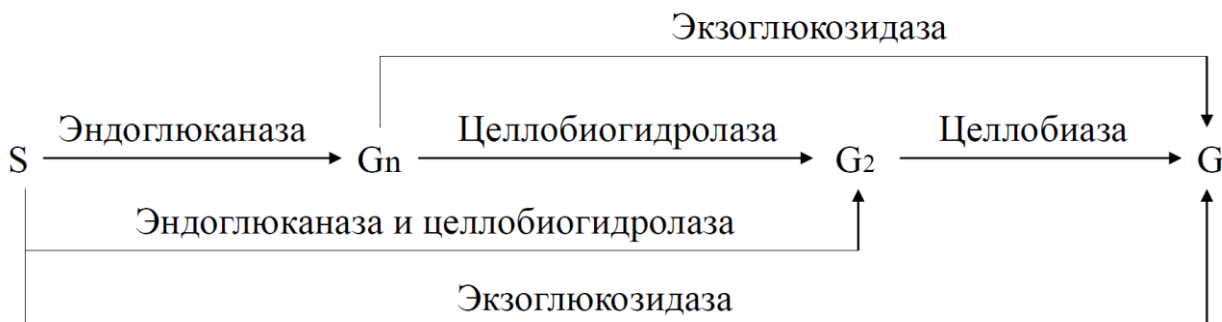
Белок амаранта входит в число лучших белков растительного происхождения и по качеству превосходит белок сои. За соотношение аминокислот, белок амаранта приближается к идеальному белку. Если оценить идеальный белок (близкий к яичному) в 100 баллов, то молочный белок казеин будет иметь 72 балла, соевый – 68, ячменя – 62, пшеницы – 58, кукурузы – 44, а амаранта – 75 баллов.

Поэтому основное внимание было сфокусировано на исследованиях целлюлозосодержащего сырья, в качестве которого использовали пшеничную солому. При этом амарант использовали для обогащения конечного продукта белком, аминокислотами, липидами и микроэлементами (таблицы 2, 3).

Известно, что гидролиз целлюлозы до глюкозы можно осуществить двумя способами: химическим и ферментативным, более перспективным из которых является последний. Более того, ферментативный гидролиз целлюлозы является экологически чистой технологией, основанной на процессах и механизмах конверсии веществ целлюлолитическими ферментами.

При ферментативном гидролизе целлюлозы и её производных, участвует комплекс целлюлаз, состоящих из четырёх видов карбогидраз: эндо-1,4-β-глюканазы (К.Ф. 3.2.1.4.); экзо-1,4-β-глюканазы (1,4-β-глюкан целлобиогидролаза К.Ф. 3.2.1.91 или 1,4-β-D-гликозидглюкогидролаза, К.Ф. 3.2.1.74) и целлобиаза (β-глюкозидаза или β-D-гликозидглюкогидролаза, К.Ф. 3.2.1.21)

Общую схему ферментативного гидролиза целлюлозы можно представить в следующем виде:



где S – исходный субстрат;

G_n – целлоолигосахариды (продукт статистического гидролиза целлюлозы);

G₂ – целлобиоза;

G – глюкоза.

В зависимости от физического состояния исходного субстрата G может представлять собой либо частично деструктурированную нерастворимую целлюлозу с относительно низкой степенью полимеризации по сравнению с исходным нерастворимым субстратом, либо набор замещённых целлодекстринов (при гидролизе растворимых производных целлюлозы, например, КМ-целлюлозы).

На эффективность ферментативного гидролиза целлюлозосодержащих субстратов, большое влияние оказывает предварительная обработка последних. Нативная пшеничная солома состоит из ориентированных в пространстве жёстко скреплённых волокон, без продольных и поперечных разрывов. Такая прочность соломины обусловлена скрученными элементарными волокнами, защищающими соломину от любого воздействия.

При термообработке, пространственная ориентация волокон нарушается в зависимости от температуры, давления и времени инкубации, проявляются продольные и поперечные разрывы волокон целлюлозы. Так, например, термообработка при температуре 121°C, давлении 1 атм., в течение 1,5 часа вызывает разрыхление волокна, происходит разрушение лигнинового слоя и продольные разрывы, что приводит к изменению химического состава соломы (табл. 4).

Таким образом, при обработке пшеничной соломы при температуре 100°C, p = 1 атм. и времени инкубации 1,5 часа, количество лигнина и клетчатки в составе соломы уменьшается, что делает её более доступной для воздействия микроорганизмов и обосновывает целесообразность применения последующего ферментативного гидролиза пшеничной соломы.

Для обогащения частично гидролизованной пшеничной соломы микробными белками, мы воспользовались методом глубинной гетерофазной ферментации. Известно, что грибы рода *Trichoderma* являются источником целлюлолитических ферментов и их биомасса содержит большое количество белков. Гриб *Trichoderma harzianum* 857, выбранный нами как продуцент для биоконверсии пшеничной соломы, хорошо растёт при глубинной гетерофазной ферментации и синтезирует

комплекс целлюлолитических ферментов на среде, содержащей измельчённую пшеничную солому, после её предварительной термообработки при 100°C, р - 1 атм. в течение 1,5 часа. В качестве посевного материала, содержащего сырьё, использовали споро-мицелиальную суспензию гриба *Trichoderma harzianum* 857.

Таблица 4

Изменение химического состава пшеничной соломы при термической обработке

Образец	Массовая доля лигнина, %	Массовая доля клетчатки, %
Солома пшеничная исходная	21,37 ± 0,81	34,02 ± 0,84
Солома пшеничная после термообработки при t – 100°C; р – 1,0 атм. τ – 1,5 часа	17,9 ± 0,13	33,52 ± 0,78
Солома пшеничная после термообработки при t – 120°C; р – 2,0 атм. τ – 15 мин	14,3 ± 0,17	31,14 ± 0,81

В качестве основных управляемых факторов, регулирующих рост и развитие продуцента, использовали температуру, рН и время инкубации. Были исследованы режимы ферментации с различными значениями вышеуказанных параметров. Эффективность режима определяли по накоплению редуцирующих сахаров в ферментализате, а также по накоплению белка.

Экспериментально установлено, что выход редуцирующих веществ зависит от температуры культивирования, рН ферментационной среды и времени ферментации. При температуре 30-35°C и рН 4,5-4,7 максимальный выход редуцирующих веществ наблюдался через 96 часов ферментации (рис. 1, 2). К этому времени достигает своего максимума и содержание белка в ферментационной среде (рис. 3).

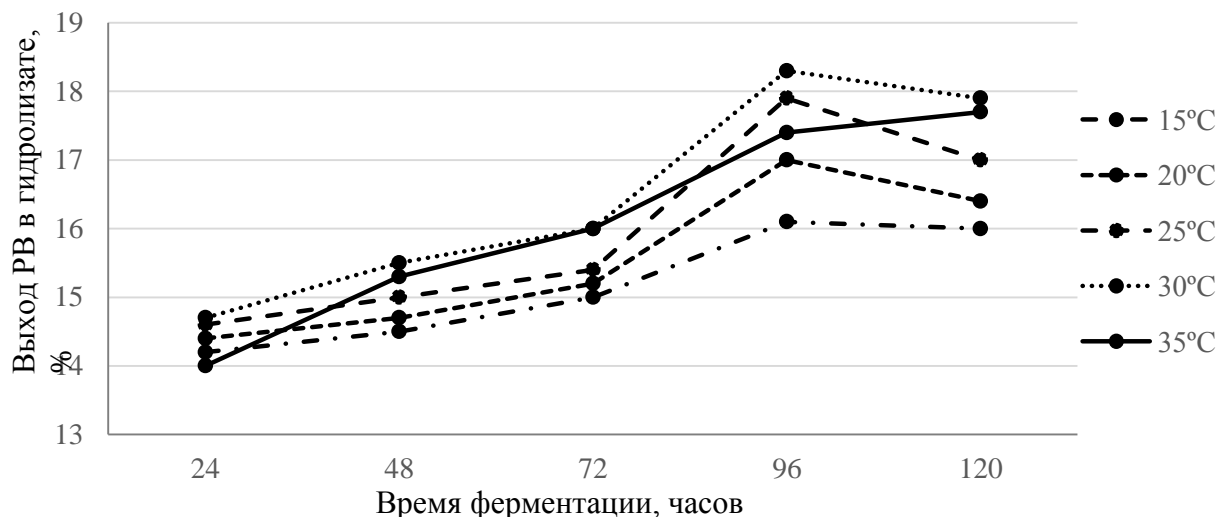


Рис. 1. Зависимость выхода редуцирующих веществ от времени ферментации и температуры среды.

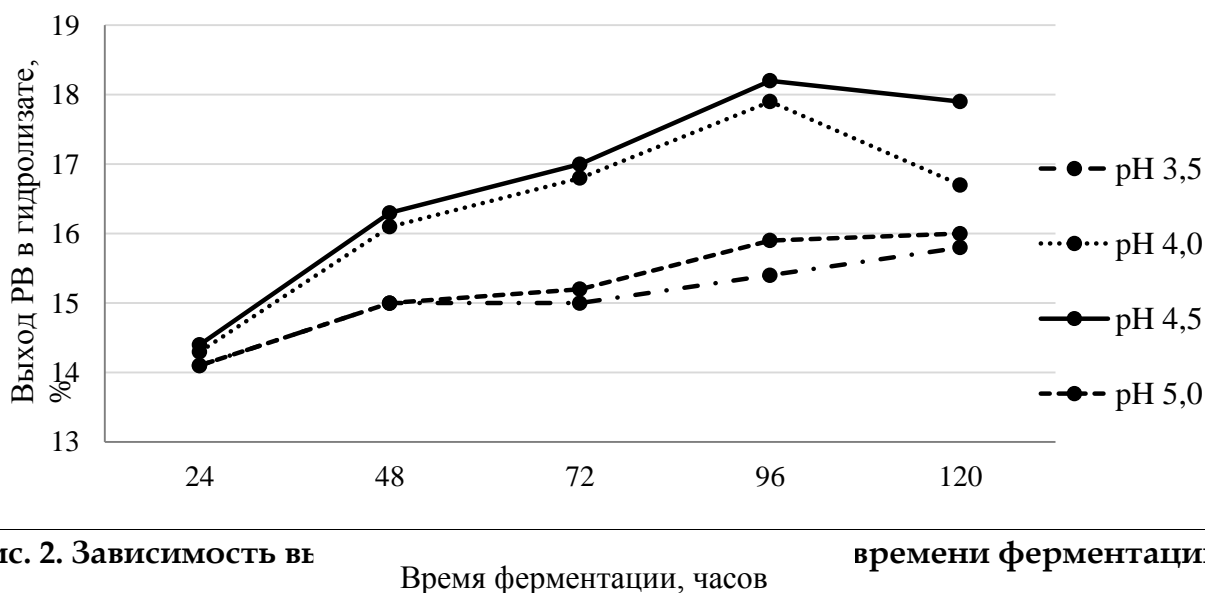


Рис. 2. Зависимость выхода редуцирующих веществ от времени ферментации и pH среды.

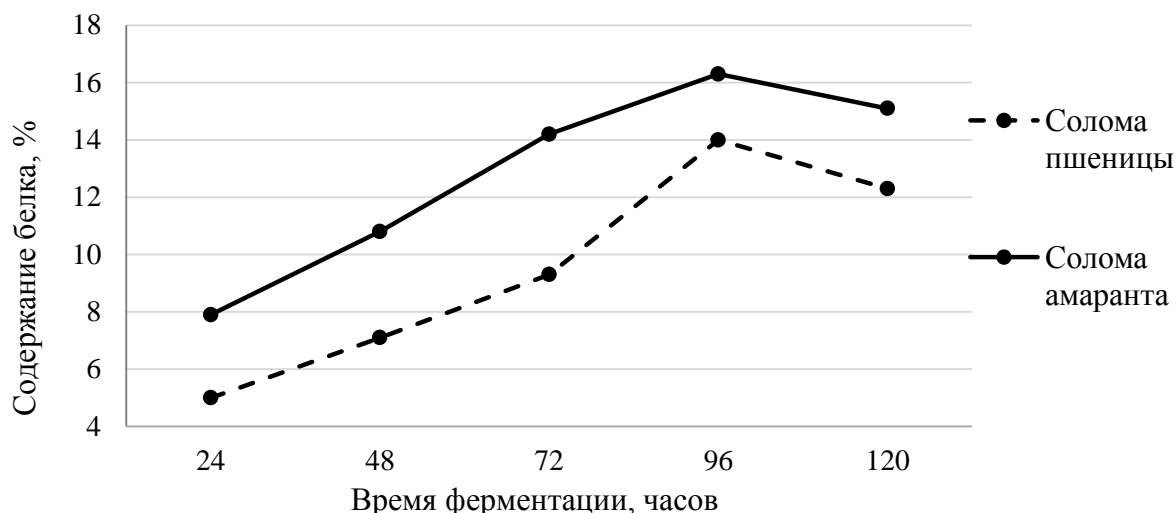


Рис. 3. Зависимость содержания белка от времени ферментации.

Заключение

Установлено, что гриб *Trichoderma harzianum* 857, благодаря синтезу внеклеточных целлюлолитических ферментов, может быть использован для гидролиза целлюлозосодержащих субстратов (пшеничной соломы). Подобраны условия предварительной обработки целлюлозосодержащего субстрата (100°C, при 1 атм. в течение 1,5 часа) для повышения эффективности их ферментативного расщепления. Показано, что внесение в состав целлюлозосодержащих субстратов соломы амаранта, способствует обогащению готового продукта белком, витаминами и микроэлементами, что даёт возможность использовать его в качестве высокобелкового продукта.

References:

1. Saleh A.M., Nevin M.F., Ebtsam N.H., Roqaya I.B. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. Journal of Biotexnology. – 2006, № 127 (1). -P. 54-64.
2. Patel N., Choy V., Malauf P., Thilault J. Growth of *Trichoderma reesei* RUT C-30 in stirred tank and reciprocating plate bioreactors. Process Biochemistry. – 2009, № 10 (1), - P. 1164-1171.
3. Harikesh B.S., Braxma N.S., Satienda P.S., Chandra S.N. Solid-state cultivation of *Trichoderma harzianum* NBRI-1055 for modulating natural antioxidants in soybean seed matrix. Bioresource Tehnology. – 2010, № 101 (16). -P. 6444-6453
4. Dedkov V.D., Gneusheva M.A., Pavlovskaya N.E. Biokonversiya solomi zlakovich kultur gribami roda *Trichoderma* v kormovie produkti dlya jivotnovodstva. Vestnik Orel GAU. – 2012, №4 (37). - S. 102-105.
5. Miettinen-Oinonen A., Paoheimo M., Lantto R., Suominen P. Enhanced production of cellobiohydrolases in *Trichoderma reesei* and evaluation of the new preparations in biofinishing of cotton. J. Biotechnol. – 2005, №. 116. - P. 305-317.

6. Mandels M., Parrish F.W., Reese E.T. Sophoroseas an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. Journal of Bacteriology. – 1962, № 83. - P. 400-408.
7. Gradova N.B., Babusenko E.S., Gornova I.B. Laboratorniy praktikum po obshchey mikrobiologii 2-e izd., pererab. i dop.-M.:DeLi print: 2004. - 144 s.
8. GOST 12575-2001. Saxar. Metodi opredeleniya redutsiruyuyux veshchestv.-Vzamen GOST 12575-86; vved.01,01,2003.-Minsk: IPK Idatelstvo standartov: 2002. -15 s.
9. GOST R 53046-2008. Preparati fermentnie. Metodi opredeleniya fermentativnoy aktivnosti sellyulazi.-vved.01.01.10.-№.:Standart inform: 2000. – 12 s.
10. http://geolike.ru/page/gl_1591.htm